

Not a divergent promoters

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, 7/04, C07K 14/055, C12N 15/38, 7/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/29248 (43) Date de publication internationale: 2 novembre 1995 (02.11.95)
--	----	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00502

(22) Date de dépôt international: 18 avril 1995 (18.04.95)

(30) Données relatives à la priorité:
94/04975 20 avril 1994 (20.04.94) FR

(71) Déposant: RHONE MERIEUX [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR).

(72) Inventeurs: AUDONNET, Jean-Christophe, Francis; 130, rue Duguesclin, F-69006 Lyon (FR). DARTEIL, Raphaël, Jean; 29, rue de Marseille, F-69007 Lyon (FR). RIVIERE, Michel, Albert, Emile; 11, chemin du Chancelier, F-69130 Ecully (FR). ZELNIK, Vladimir, Sevcenkova 26, 85 105 Bratislava (SK). ROSS, Louis, Joseph, Norman; 139 Andover Road, Newbury RG14 6JJ (GB).

(74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc.; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).

(81) Etats désignés: AU, BR, CA, JP, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: HERPES VIRUS TRANSFORMED TO EXPRESS gD *IN VITRO*

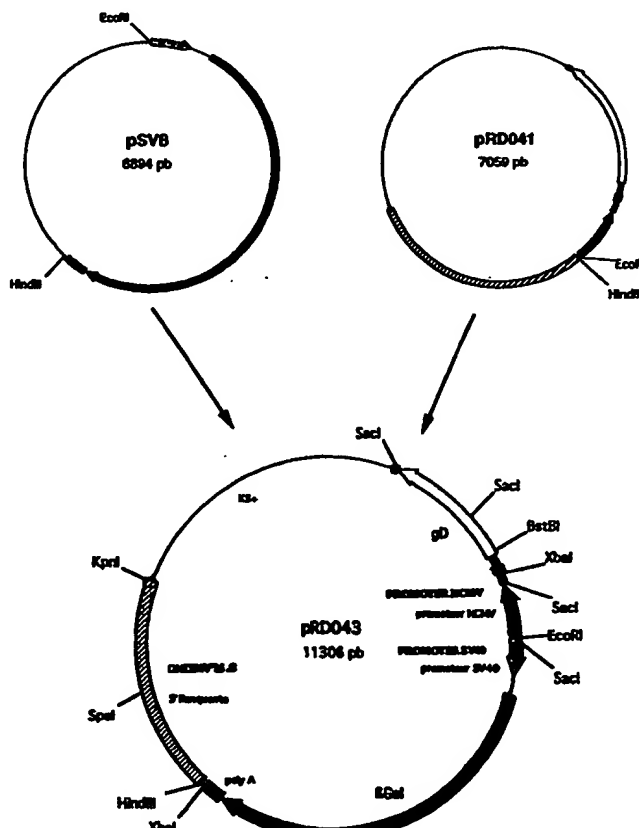
(54) Titre: HERPESVIRUS TRANSFORMES POUR EXPRIMER gD *IN VITRO*

(57) Abstract

The herpes viruses which present a natural deficiency in gD, that is to say which do not express their gene gD *in vitro* or which do not have said gene, are transformed to express gD *in vitro*. This transformation by genetic recombination may comprise the replacement of the natural promoter by another one or the insertion of an expression cassette containing gD and a promoter. The invention also relates to these viruses incorporating a gene coding for an antigen of interest, the vaccines obtained and the culture methods thus improved. The invention relates particularly to the fowl herpes viruses, particularly MDV, and the virus VZV.

(57) Abrégé

Les herpesvirus naturellement déficients en gD, c'est-à-dire n'exprimant pas leur gène gD *in vitro* ou ne possédant pas ce gène, sont transformés pour exprimer gD *in vitro*. Cette transformation par recombinaison génétique peut consister dans le remplacement du promoteur naturel par un autre ou l'insertion d'une cassette d'expression contenant gD et un promoteur. L'invention concerne aussi ces virus incorporant un gène codant pour un antigène d'intérêt, les vaccins obtenus et les procédés de culture ainsi améliorés. L'invention concerne notamment les herpesvirus aviaires, en particulier MDV, et le virus VZV.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Herpèsvirus transformés pour exprimer gD in vitro

La présente invention a trait à de nouveaux
herpèsvirus recombinés obtenus à partir d'herpèsvirus
naturellement déficients en gD, notamment herpèsvirus
5 aviaires et alphaherpèsvirus, en particulier
alphaherpèsvirus aviaires et plus particulièrement MDV
sérotypes 1, 2 et 3, ainsi que notamment VZV. Elle a
également trait entre autres à leur utilisation comm
10 vaccins et à leur procédé de préparation.

Le virus responsable de la maladie de Marek (Marek's disease virus ou MDV) chez le poulet est un alphaherpèsvirus. Trois sérotypes du virus MDV sont décrits (Bülow V.V. et Biggs P.M., Avian Pathology, 1975, 4, 133-146). Seuls les virus du sérotype 1 oncogènes sont pathogènes chez le poulet. Leur réplication chez l'hôte provoque la formation de lymphomes des cellules T et une démyélination des nerfs périphériques moteurs se traduisant en général par des signes de parésie ou de paralysie chez les animaux atteints (Calnek et Witter, Marek's Disease in Diseases of Poultry 9th edition, pp 342-390, Calnek B.W. et al. Ed. 1991, Iowa State Univ. Press). Cette maladie, aux conséquences économiques très importantes pour l'élevage aviaire, est prévenue par une vaccination des poussins d'un jour avec soit l'herpèsvirus du dindon (Herpesvirus of turkey ou HVT ou encore MDV de sérotype 3), virus antigéniquement proche du virus MDV mais non pathogène chez le poulet, soit des souches vivantes MDV non oncogènes et non pathogènes chez le poulet, appartenant aux sérotypes 1 ou 2.

Pour les besoins de la production de vaccins, ces trois sérotypes sont principalement cultivés sur cellules primaires d'embryons de poulets (CEPs). Les cellules primaires d'embryons de canards peuvent également être utilisées pour multiplier les virus MDV de sérotype 2. Lors de la culture in vitro, ces virus sont fortement associés aux cellules. Ce phénomène est connu depuis longtemps (Churchill A.E. et Biggs P.M. Nature, 1967, 215, 528-530), et il a été également constaté que les virions produits après culture sur CEPs étaient non infectieux par voie orale ou nasale pour les poulets. La vaccination avec ces virus nécessite donc leur administration par voie parentérale, en général par transfixion de la membrane alaire ou par injection intramusculaire, ce qui augmente de

façon non négligeable le coût de la vaccination contre la maladie de Marek.

Il existe par contre chez le poulet une production de virus MDV infectieux, c'est-à-dire transmissible par voie aérienne ou par simple contact, au cours de l'infection par les souches pathogènes du virus MDV. Cette production de virus infectieux se fait au niveau des follicules plumeux, et le virus est disséminé dans l'environnement par l'intermédiaire des plumes de mue, des squames et des poussières (Calnek B.W. et al., Avian Diseases, 1970, 14, 219-233). C'est par ce mécanisme que s'effectue la diffusion naturelle de la maladie dans les élevages. Les différences observées entre la culture in vitro et la réplication in vivo du virus MDV n'ont jamais été expliquées jusqu'à ce jour.

L'étude de la culture in vitro des virus HVT ou MDV sur CEPs a montré que ces virus étaient étroitement associés aux membranes cellulaires. Cela a pour conséquence la quasi absence de virions libres et infectieux dans les surnageants de cultures.

Il vient d'être montré récemment qu'un gène codant pour une glycoprotéine homologue de HSV-1 gD est présent sur les génomes respectifs des virus HVT et MDV (Ross L.J.N. et al., J. Gen. Virol. 1991, 72, 949-954 ; Zelnik V. et al., J. Gen. Virol. 1993, 74, 2151-2162). Les produits d'expression de ces gènes chez HVT et MDV ont été étudiés et recherchés dans les lysats de CEPs infectées par ces virus. Ces expériences n'ont toutefois pas permis de démontrer l'expression de la glycoprotéine gD chez ces deux virus.

En effet, des antigènes MDV gD exprimés sous forme de protéines de fusion avec la protéine TrpE chez E. coli ont été utilisés pour induire la production d'anticorps chez des lapins et, curieusement, les sérums

ainsi préparés n'ont pas reconnu de protéine spécifique dans les lysats de CEPS infectées avec HVT ou MDV, alors que les anticorps préparés à partir de protéines de fusion exprimant des antigènes MDV gI ou MDV gE reconnaissent les glycoprotéines correspondantes exprimées par les virus MDV ou HVT au cours de la culture in vitro (Brunovskis P. et al, Proceedings 19th World's Poultry Congress, pp118-122. Amsterdam, 19-24 Septembre 1992). Cela indique soit une absence d'expression, soit un très faible niveau d'expression de gD au cours de la culture in vitro de HVT et MDV.

A l'inverse, des sérums de poulets infectés par les souches pathogènes de MDV reconnaissent les antigènes HVT gD ou MDV gD exprimés sous forme de protéines de fusion avec la glutathion-transférase (Zelnik V. et al., Proceedings 19th World's Poultry Congress, pp 114-117. Amsterdam, 19-24 Septembre 1992). Ces résultats montrent que les gènes HVT gD et MDV gD sont bien exprimés au cours de la répllication in vivo chez le poulet et que les glycoprotéines respectives sont non seulement immunogènes, mais partagent aussi certains déterminants antigéniques. Il est à noter que chez la plupart des alphaherpèsvirus étudiés à ce jour, la glycoprotéine gD est un immunogène majeur qui contribue de façon significative à l'induction de l'immunité protectrice antivirale chez l'animal infecté ou immunisé.

X. Tan et L.F. Velicer (Abstracts of the XVIII International Herpesvirus Workshop, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA, 1993, p.A145) ont aussi déclaré que gD n'était pas exprimé en culture cellulaire, ou tout au moins pas à un niveau détectable par Northern blot, ce qui pourrait expliquer la nature cellule-associée du virus MDV. Ces auteurs proposent que MDV gD est exprimé dans l'épithélium des follicules plumeux de poulet

où MDV est formé sous forme de virions infectieux enveloppés non associés aux cellules.

La présente invention est basée sur la découverte que la mise en oeuvre d'une expression constitutive de la glycoprotéine gD par le virus MDV, y compris HVT, permet de manière surprenante d'obtenir, comme lors de l'infection chez le poulet, des virions libres non associés aux cellules. Cette particularité offre la possibilité très avantageuse d'administrer ce virus par voie aérienne à des fins vaccinales et permet par ailleurs d'obtenir du virus libre dans le surnageant des cultures in vitro, ce qui facilite l'obtention et la fabrication du vaccin contre la maladie de Marek.

De manière surprenante, la présente invention permet, par remplacement du promoteur naturel du gène gD chez les virus HVT et MDV par un autre promoteur, l'expression in vitro des glycoprotéines HVT gD et MDV gD. L'expression de gD, obtenue notamment en plaçant ce gène sous le contrôle d'un promoteur non régulé par le virus, permet la maturation complète des virions qui peuvent alors "sortir" librement des cellules infectées. Cette expression de gD in vitro est réalisée en remplaçant le promoteur naturel du gène gD par un autre promoteur qui peut être notamment choisi parmi les promoteurs eucaryotes forts classiquement connus (par exemple promoteurs HCMV IE, SV40, ou promoteurs précoces endogènes des virus HVT ou MDV...) ou promoteurs tardifs (par exemple promoteurs tardifs de MDV ou HVT, notamment de gB MDV ou HVT,...). Cette expression nouvelle peut être obtenue en utilisant les moyens offerts par les techniques de recombinaison génétique, en remplaçant par exemple la région située en amont de l'ATG du gène gD par un promoteur exogène de type HCMV IE ou SV40, ou en transposant le gène gD dans la région unique longue du virus et en le plaçant sous le

contrôle d'un promoteur endogène ou exogène. De nombreuses possibilités sont ainsi réalisables pour l'expression du gène gD en combinant différents promoteurs et différents sites d'insertion potentiels (tels que les sites RR2, TK, gD, gI, US3, US2, US10...).

Cette expression a des conséquences nouvelles et inattendues sur les propriétés biologiques du virus recombinant. L'expression de la glycoprotéine gD au cours de la réplication in vitro des virus recombinants HVT et MDV ainsi construits se traduit en effet par l'incorporation de la glycoprotéine gD dans l'enveloppe virale et par l'obtention de virions infectieux à un titre élevé dans les surnageants de culture. Par ailleurs, les virus recombinants ainsi obtenus, tout en gardant les caractères d'atténuation des virus parentaux, sont plus infectieux pour les lymphocytes in vivo et se répliquent plus rapidement dans ces cellules. Cela a pour conséquence directe une plus grande et une plus rapide diffusion de ces virus au sein de l'organisme du poulet. La protection contre la maladie de Marek est donc meilleure, quelle que soit la voie d'administration (oronasale ou parentérale). Du fait de ces modifications biologiques dans la réplication du virus, la protection contre la maladie de Marek peut être obtenue plus précocément et avec des doses vaccinales beaucoup plus réduites qu'avec les vaccins classiquement utilisés.

On a en outre découvert qu'il était possible d'étendre cet enseignement aux autres herpèsvirus dont la structure génomique et les propriétés biologiques in vitro et in vivo sont équivalentes à celles des herpèsvirus aviaires mentionnés ci-dessus. Par exemple, la présente invention permet l'obtention d'un virus VZV recombiné exprimant le gène gD d'un autre virus tel que HSV-1 ou HSV-2, avec pour conséquence très avantageuse la production de

virus VZV libre par culture in vitro sur cellules. Ce virus recombiné peut constituer un vaccin contre VZV et contre le virus dont est issu le gène gD, par exemple HSV-1 ou HSV-2.

5 Il existe en fait deux grands types de virus concernés par l'invention, qui correspondent à la définition de virus déficient en gD, à savoir ceux qui n'expriment pas gD in vitro en cultures cellulaires, ce qui est le cas des virus MDV, y compris HVT, et ceux qui sont dépourvus d'un gène homologue du gène gD, ce qui est le cas
10 du virus VZV (varicella-zoster virus).

L'invention concerne donc tous les herpèsvirus équivalents, dans le sens qui vient d'être défini, aux virus-types MDV et VZV.

15 La présente invention a donc pour objet un herpèsvirus naturellement déficient en gD (dans le sens de l'invention défini ci-dessus), transformé pour exprimer une glycoprotéine gD au cours de sa réplication in vitro. De préférence, il s'agit d'un herpèsvirus aviaire, notamment virus MDV des sérotypes 1, 2 et 3 ou bien du virus de la varicelle VZV.
20

Selon un premier mode de réalisation préféré de l'invention, qui concerne les herpèsvirus ayant un gène gD non exprimé in vitro, l'herpèsvirus a son gène gD placé sous le contrôle d'un promoteur autre que le promoteur naturel de ce gène. Le promoteur naturel du gène gD est
25 remplacé par un promoteur endogène (c'est-à-dire un promoteur de ce virus ou des autres sérotypes de ce virus, notamment un promoteur précoce) ou exogène, permettant l'expression du gène gD in vitro.

30 Dans un deuxième mode de réalisation préféré de l'invention, l'herpèsvirus comprend une cassette d'expression comportant le gène gD placé sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression lors de la réplication du virus in vitro.

Dans le cas d'un herpèsvirus ne présentant pas naturellement de gène gD, la cassette comprend le gène gD d'un autre virus, par exemple de HSV ou même d'un virus tel que MDV, y compris HVT, et un promoteur approprié qui peut être le promoteur naturel du gène inséré ou être un autre promoteur, ce qui sera le cas lorsque le gène gD proviendra d'un virus du type MDV, la condition étant d'obtenir une expression du gène gD in vitro.

Dans le cas d'un herpèsvirus seulement déficient dans l'expression de gD in vitro, la cassette peut aussi comprendre aussi bien le gène gD endogène qu'un autre gène gD, et un promoteur approprié comme défini ci-dessus.

La cassette d'expression est insérée dans un site non essentiel pour la réplication du virus et pour l'efficacité du virus à titre de vaccin. Pour les virus MDV des sérotypes 1, 2 et 3, un site d'insertion est avantageusement choisi parmi le groupe consistant en: US2, US3, US10, gI, gD, TK, RR2, UL13. On comprend bien entendu que cette énumération n'est pas limitative et que tout site d'insertion potentiel peut être utilisé. Pour le virus VZV, on peut choisir un site d'insertion parmi le group consistant en: TK, US3, gI, gE, gC, région intergénique US3-gI.

On comprend que le gène gD, au sein d'une cassette telle que définie ci-dessus et quelle que soit son origine, peut être inséré dans MDV, ou autre virus du même type, à la place du gène gD lui-même ou dans un autre site d'insertion.

La présente invention a de préférence pour objet un herpèsvirus choisi parmi le groupe consistant en: MDV des sérotypes 1, 2 et 3 et VZV, exprimant une glycoprotéine gD au cours de sa réplication in vitro.

La présente invention a pour objet la production in vitro de virus, notamment HVT et MDV, infectieux, sous

forme de virions libres présents dans le surnageant de culture de cellules. Les techniques de culture sont notamment celles habituellement utilisées dans la pratique pour un virus donné. Celles-ci sont bien connues de l'homme du métier et n'ont donc pas à être décrites plus en détail
5 ici. L'utilisation des virus transformés conformément à l'invention dans la production de virus facilite la fabrication de vaccins, notamment ceux contre la maladie de Marek, et de virus recombinants, notamment HVT et MDV, en permettant d'obtenir un effet cytopathique généralisé plus
10 rapide (2 à 3 jours selon la richesse de l'inoculum) et une meilleure résistance du virus aux opérations de conservation par congélation ou par lyophilisation. On obtient avantageusement des titres élevés en virus libres dans le surnageant de culture en comparaison de ce qui est
15 obtenu en l'absence d'expression de gD. Il s'agit là d'un résultat remarquable.

L'invention a donc pour objet un procédé de culture d'herpèsvirus naturellement déficient en gD, dans lequel on cultive sur cellules le virus qui a été
20 transformé par recombinaison génétique pour exprimer la glycoprotéine gD, puis l'on recueille les virions produits dans le surnageant de culture. Les techniques de culture des virus sont notamment celles habituellement utilisées dans la pratique. L'homme du métier est parfaitement au
25 fait des techniques appropriées à chaque virus et celles-ci n'ont donc pas à être décrites plus en détail ici.

L'invention a également pour objet les cultures d'herpèsvirus susceptibles d'être obtenues par ce procédé. Ces cultures se caractérisent notamment par le fait
30 qu'elles comprennent le virus, notamment MDV, HVT, VZV, à l'état de virion libre, c'est-à-dire non associé à des cellules, et présentent les propriétés et qualités déjà indiquées.

La présente invention a aussi pour objet la production in vitro de virus, notamment HVT ou MDV, infectieux qui peuvent être utilisés comme vecteurs d'expression pour des gènes étrangers, en particulier pour des gènes ou des fractions de gènes codant pour des antigènes induisant une protection contre des maladies, en particulier une protection des oiseaux d'élevage contre des virus, bactéries ou parasites pathogènes responsables de maladies aviaires, et plus particulièrement des poulets.

L'invention a donc également pour objet les herpèsvirus tels que définis plus haut, qui comprennent en outre au moins un gène hétérologue inséré dans leur génome de manière que ce gène puisse s'exprimer in vivo. Pour cela, le virus recombiné peut comprendre soit une double cassette incluant le gène gD, le promoteur de celui-ci et le gène codant pour l'antigène avec un promoteur approprié, la cassette pouvant être insérée dans le site gD pour un virus tel que MDV, ou dans un autre site, soit une cassette pour chaque gène, celle comprenant le gène gD pouvant être insérée par exemple dans un site autre que le site gD naturel dans le cas d'un virus tel que MDV et l'autre cassette pouvant être insérée par exemple dans le site gD naturel, ou dans tout autre site approprié, soit encore seul le promoteur naturel du gène gD est remplacé et la cassette comprenant le gène hétérologue est insérée dans un autre site approprié.

Il est remarquable de noter que lorsque le virus tel que MDV a été transformé pour exprimer un gène gD endogène ou d'un autre sérotype sous le contrôle d'un promoteur efficace selon l'invention, ce gène inséré est exprimé in vivo au cours de la virémie et pas seulement dans les follicules plumeux (cas du gD naturel), ce qui se traduit notamment par une réponse immunitaire, en particulier cellulaire, plus forte et plus précoce.

La présente invention a encore pour objet la production de vaccins avantageusement utilisables par les voies aérienne (nasale, oculaire), orale ou parentérale, notamment pour immuniser les poulets contre la maladie de Marek et les autres maladies correspondant aux antigènes spécifiques exprimés par les virus HVT ou MDV recombinants.

Les vaccins selon l'invention se caractérisent par le fait qu'ils comprennent un virus vivant tel que défini plus haut et qu'ils peuvent se présenter notamment sous la forme lyophilisée ou congelée.

Le procédé de production d'un vaccin vivant selon l'invention se caractérise par le fait que l'on cultive sur cellules un herpèsvirus naturellement déficient en gD, qui a été transformé pour exprimer gD lors de sa répllication in vitro et éventuellement transformé pour exprimer in vivo au moins un gène hétérologue codant pour un antigène ou immunogène vaccinal.

La présente invention a également pour objet la production de vaccins administrables in ovo pour vacciner les poulets contre la maladie de Marek et les vaccins obtenus.

La présente invention a de manière spécifique pour objet l'utilisation du gène gD comme locus d'insertion pour construire des herpèsvirus aviaires recombinants, notamment HVT ou MDV, exprimant en sus des gènes étrangers d'intérêt vaccinal.

La présente invention a aussi pour objet l'obtention de virus aviaires, notamment HVT ou MDV, infectieux pouvant servir de vecteurs pour l'expression d'antigènes étrangers et permettant la vaccination in ovo.

La présente invention a aussi pour objet une méthode de vaccination notamment des oiseaux d'élevage, utilisant les virus transformés conformément à l'invention et prévoyant notamment leur administration par voie

aérienne, bien que les autres voies ne soient pas exclues.

Enfin, la révélation du principe à la base de l'invention permet à l'homme du métier de rechercher aussi chez les virus du type MDV des mutants naturels exprimant gD in vitro. Ces mutants entrent alors dans le cadre de l'invention.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'exemples de réalisation se référant au dessin, dans lequel on voit:

- 10 - à la figure 1: par digestion du plasmide pRD001 comprenant un fragment de 29 kpb de l'ADN de HVT, construction des plasmides pRD006 et pRD007 qui comprennent respectivement un fragment de 2,8 kb incluant la partie de gD en 5' de PstI et un fragment de 5,7 kb incluant la
- 15 - partie de gD en 3' de PstI;
- à la figure 2: construction du plasmide pRD015 comprenant la partie flanquante en 5' de gD, à partir du plasmide pRD001;
- à la figure 3: plasmide pRD022 obtenu à partir du vecteur
- 20 pBS-SK+ et comprenant le gène gD dépourvu de sa partie en 5' du site SacI;
- à la figure 4: plasmide pRD030 comprenant l'entièreté du gène gD et des sites de restriction l'encadrant;
- à la figure 5: à partir du pCMV β , construction du
- 25 plasmide pRD031 contenant le gène gD sous le contrôle du promoteur HCMV IE, par remplacement du gène LacZ par gD;
- à la figure 6: plasmide pRD040 comprenant une cassette incluant le gène gD et le promoteur HCMV IE, dans le vecteur pBS-SK+;
- 30 - à la figure 7: construction du plasmide pRD041 obtenu par addition, au plasmide pRD040, de la séquence 5' flanquante contenue dans le plasmide pRD015;
- à la figure 8: construction du plasmide pRD043 comprenant le gène gD, le promoteur HCMV, et l'ensemble promoteur SV40

- et gène LacZ apporté par pSV β dans pRD041 entre le promoteur HCMV et la séquence 5' flanquante;
- à la figure 9: construction du plasmide pRD046 à partir du plasmide pBamB contenant un fragment HVT BamHI B incluant le gène TK;
 - à la figure 10: construction du plasmide pRD051 par introduction d'un site de restriction multiple dans le site unique DraIII du plasmide pRD049;
 - à la figure 11: construction du plasmide pRD053 comprenant la cassette promoteur HCMV et gène HVT-gD insérée dans le gène TK de HVT.

EXEMPLES

Toutes les techniques utilisées pour les constructions des plasmides donneurs sont les techniques standards de biologie moléculaire décrites par Sambrook et al. (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Edition, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). Le contenu de cette publication est considéré comme étant incorporé par référence dans cette description.

Exemple 1 :

Cet exemple avait pour double objectif de démontrer d'une part l'expression de gD dans l'épithélium des follicules plumeux du poulet et d'autre part que, conformément à l'invention, la non expression de gD in vitro est bien liée au promoteur naturel et peut être obtenue par le remplacement du promoteur naturel par un autre promoteur.

- Plumes et tissus :

Des poussins Rhode Island Red (HPRS RIR) d'un jour ont reçu 1000 u.f.p. (unités formatrices de plaques) d'une souche de MDV RB1B ou HPRS16 et les plumes, bourses, thymus et rates ont été prélevés 4 à 6 semaines après l'inoculation. Les mêmes tissus provenant de poulets SPF

non infectés ont servi de témoins.

Les plumes obtenues à partir des régions dorsale et pectorale ont été prises à l'extrémité proximale et les pointes de plume d'environ 0,5 cm de long ont été hachées avec des ciseaux et mises en suspension dans du PBS ou dans un tampon d'extraction (dithiothreitol 5mM, PMSF 50 μ g/ml, sarkosyl 1,5 %). En règle générale, on a utilisé 20 pointes de plume par ml de tampon. Après une incubation de 24 à 36 heures à 4°C, les préparations ont été traitées aux ultrasons (3 x 30 s) et centrifugées à 10 000 tr/min dans une microcentrifugeuse. Les surnageants, contenant habituellement 2 μ g de protéine par μ l, ont été utilisés pour une analyse en Western blot.

Les antigènes ont été extraits des bourses, thymus et rates à l'aide des mêmes tampons que ceux utilisés pour les plumes.

- CEP infectés par un recombinant vaccine-gD :

Des fibroblastes d'embryon de poulet (CEP) ont été infectés par un recombinant vaccine-gD (virus de la vaccine comportant le gène gD inséré dans un site non essentiel à sa réplication et sous le contrôle d'un promoteur endogène vaccine) à une multiplicité d'infection d'environ 1 u.f.p./cellule et ont été récoltés 3 à 4 jours plus tard lorsque les e.c.p. (effets cytopathiques) étaient très prononcés. Les cellules ont été raclées, rapidement lavées en PBS, et traitées aux ultrasons en PBS à une concentration de 2.10^7 cellules/ml.

- Western blot :

Les échantillons destinés à l'analyse en Western blot ont été portés à ébullition dans un tampon dénaturant et 10 μ g de plumes ou de tissus ont été appliqués par puits (ou piste). Dans le cas d CEP infectés par la vaccine-gD, seulement 4 μ g ont été appliqués par puits. Les polypeptides ont été séparés par électrophorèse sur gel

d'acrylamide 12 % en utilisant un appareil mini-gel Biorad et ont été transférés sur nitrocellulose (Hybond C, Amersham). Après transfert, les polypeptides ont été colorés au rouge Ponceau et photographiés pour s'assurer
5 que les quantités de protéine déposées dans chaque puits étaient comparables.

Les blots ont été rincés avec du PBS, bloqués avec 5% de lait écrémé en PBST (25 mM Tris pH 7,6, 0,14 M NaCl et 0,05 % Tween 20) et lavés 4 fois dans du PBST,
10 chaque fois pendant 5 min. Ils ont ensuite été traités avec un surnageant de l'hybridome DA7 (spécifique de gD) dilué au 1/50 dans du PBS contenant 1 % de BSA, pendant 1 h à température ambiante. Après 4 lavages dans du PBST, les blots ont été incubés avec des IgG de chèvre anti-souris
15 conjuguées à la peroxydase (Sigma) diluées au 1/1000 en PBST et les anticorps liés ont été détectés par chimioluminescence (réactif chimioluminescent pour Western blotting Dupont, Dupont). Des pellicules sensibles aux rayons X ont été exposées de 30 secondes à 1 minute selon
20 la technique classique.

- Test d'immunofluorescence :

Des sections de peau effectuées avec un microtome (Cryostat) ont été fixées à l'acétone pendant 10 min à température ambiante. Elles ont été séchées à l'air,
25 traitées avec 5% de BSA en PBS pendant 30 min à température ambiante pour empêcher les réactions non spécifiques. L'anticorps monoclonal DA7 (dilution au 1/100 en BSA 1% en PBS) ou d'anticorps monoclonal BD1 (liquide d'ascite de souris spécifique de pp38/24 dilué au 1/1000 en BSA 1% en PBS) a ensuite été ajouté pendant 1 h à température
30 ambiante. Les lames ont été lavées 3 fois en PBS, chaque fois pendant 15 min. Des IgG de chèvre anti-souris conjuguées à la FITC, diluées au 1/100 en BSA 1% en PBS, ont ensuite été ajoutées pendant 1 h à température

ambiante. Les lames ont été lavées 4 fois en PBS, chaque fois pendant 15 min, plongées dans l'eau, montées dans du glycérol/PBS et examinées sous lumière UV à l'aide d'un microscope à fluorescence.

- Résultats :

L'analyse Western blot a montré que les préparations de plumes provenant de 3 poulets différents infectés par MDV réagissaient avec l'anticorps monoclonal DA7. L'anticorps a reconnu un polypeptide apparaissant sous forme d'une bande à 55 kDa, ce qui est conforme à la taille attendue pour gD et au produit de traduction in vitro du gène MDV gD (Zelnik et al., J. Gen. Virol. 75, 2747-2753). Des produits de plus faible poids moléculaire (35 kDa et inférieurs) ont été révélés et pourraient correspondre à des formes non glycosylées.

Cela démontre l'expression de gD dans les follicules plumeux chez les poulets infectés par MDV.

Des extraits de poulets non infectés, de CEP non infectés et de CEP infectés par la vaccine seule n'ont pas réagi avec le monoclonal DA7, ce qui démontre la spécificité du test. Les extraits de CEP infectés avec le recombinant vaccine-gD ont donné deux bandes, dont une bande correspondant à la bande 55 kDa de l'essai avec les extraits de plume.

La spécificité du test a encore été contrôlée en démontrant que le monoclonal dirigé contre pp38/24 ne réagissait ni avec les CEP infectés par le recombinant vaccine-gD, ni avec les CEP non infectés. Par contre, ce monoclonal réagit bien comme attendu avec les extraits de plumes de poulets infectés et avec des CEP infectés par MDV.

On a donc démontré qu'à la fois les préparations de plume infectées par MDV et les CEP infectés par le recombinant vaccine-gD réagissaient avec le monoclonal

anti-gD et donc que l'expression de ce gène était obtenue in vitro.

Le remplacement du promoteur naturel du gène gD par un autre promoteur permet donc d'exprimer gD in vitro.

5 Exemple 2: Construction du plasmide pRD043

La souche FC126 du virus HVT a été isolée en 1968 par le Dr Witter du Regional Poultry Research Laboratory (U.S.D.A., East Lansing, Michigan, U.S.A.), dans un troupeau de dindes de 23 semaines (R.L. Witter et al., Am. J. Vet. Res. 31, 525-538, 1970). Elle a été ensuite passée 10 fois sur des fibroblastes de canard, puis a subi 9 passages supplémentaires sur des fibroblastes d'embryons de poulets EOPS. L'ADN utilisé provient de virus ayant fait l'objet au total de 23 à 24 passages à partir de l'isolat d'origine.

15 On pourrait aussi utiliser par exemple la souche HVT enregistrée à l'ATCC sous la référence VR584C.

L'ADN génomique du virus HVT a été extrait selon la technique décrite par N. Ross (Ross L.J.N. et al., J. Gen. Virol. 1989, 70, 1789-1804 incorporé ici par référence). Cet ADN a été digéré par BamHI, puis le fragment A de 29 kpb (Igarashi T. et al., Virology 1987, 157, 351-358), comprenant la région Us de HVT, a été cloné dans le vecteur pBR322 préalablement digéré par BamHI pour donner le plasmide pRD001. pRD001 a été digéré par PstI et les fragments PstI-PstI 2,8 kpb et 5,7 kpb ont été clonés dans le plasmide pBR322 digéré par PstI pour donner respectivement les plasmides pRD006 et pRD007 (Figure 1).

25 pRD001 a été digéré par XhoI et le fragment XhoI-XhoI 3,5 kpb a été cloné dans le vecteur pBluescript KS+ pour donner le plasmide pRD015 (Figure 2). Le plasmide pRD006 a été digéré par SacI et PstI pour isoler le fragment SacI-PstI de 340 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides RD045 (SEQ ID No. 1 :5'

5 TGCTGGTACCGTCGACAAGCTTGGATCCGTGCAGATAACACGTACTGGC 3') et
pBR Pst- (SEQ ID No. 2 : 5' CATGTAACCTCGCCTTGATC 3') et la
matrice pRD007 pour amplifier la région 3' du gène gD
(positions 6491 à 6980 sur la séquence HVT Us (Zelnik V. et
al., J. Gen. Virol. 1993, 74, 2151-2162 incorporé ici par
référence)). Le fragment PCR de 560 pb a été ensuite digéré
par PstI et KpnI pour isoler un fragment B PstI-KpnI de
520 pb. Les fragments A et B ont été clonés dans le vecteur
pBS-SK+ préalablement digéré par SacI et KpnI pour donner
10 le plasmide pRD022 (Figure 3), comprenant le gène gD
dépourvu d'une partie 5'.

Le plasmide pRD022 a été digéré par BamHI et
SacI pour isoler le fragment BamHI-SacI de 850 pb
(fragment C). Une PCR a été réalisée avec les
15 oligonucléotides RD050 (SEQ ID No. 3 : 5'
TGCTGAATTCGCGGCCGCATGATTATTGTCACCACTTC GAAGATGGC 3') et
HVT40M1 (SEQ ID No. 4 : 5' GTCCCCGTTGACAACTACTA 3') et la
matrice pRD006 pour amplifier la région 5' du gène gD
(positions 5747 à 6286 sur la séquence HVT Us (Zelnik V. et
al., J. Gen. Virol. 1993, 74, 2151-2162)). Le fragment PCR
20 de 560 pb a été digéré par EcoRI et SacI pour isoler un
fragment D EcoRI-SacI de 420 pb. Les fragments C et D ont
été clonés dans un vecteur pBS-SK+ modifié, ne comportant
plus les sites XbaI et SpeI (pBS-SK+ digéré par XbaI et
SpeI, puis ligaturé), digéré par EcoRI et BamHI pour
25 donner le plasmide pRD030 (Figure 4), comprenant le gène
gD.

Le plasmide pRD030 a été digéré par NotI pour
isoler le fragment NotI-NotI de 1250 pb. Ce fragment a été
cloné dans le vecteur pCMV β (CLONTECH Laboratories, Palo
30 Alto, CA) digéré par NotI pour l'insertion du gène gD à la
plac de LacZ, ce qui donne le plasmide pRD031 (4944 pb)
contenant le gène HVT-gD sous le contrôle du promoteur HCMV
IE (Figure 5).

Le plasmide pRD031 a été digéré d'une part par EcoRI et BstBI et d'autre part par BstBI et BamHI pour isoler respectivement le fragment EcoRI-BstBI de 800 pb et le fragment BstBI-BamHI de 1250 pb. Ces deux fragments ont été clonés dans le vecteur pBS-SK+ digéré par EcoRI et BamHI pour donner le plasmide pRD040 (Figure 6) comprenant le promoteur HCMV et gD dans le vecteur SK+.

Le plasmide pRD015 a été digéré par KpnI et BstBI pour isoler un fragment KpnI-BstBI de 2100 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-KS+ digéré par KpnI et ClaI pour donner le plasmide pRD033 (5024 pb). Le plasmide pRD040 a été digéré par EcoRI et SpeI pour isoler le fragment EcoRI-SpeI de 2000 pb. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pRD033 digéré par EcoRI et XbaI pour donner le plasmide pRD041 (Figure 7) comprenant gD, le promoteur HCMV et la région 5' flanquante.

Le plasmide pSV β (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA) a été digéré par EcoRI et HindIII pour isoler le fragment EcoRI-HindIII de 4300 pb. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pRD041 digéré par EcoRI et HindIII pour donner le plasmide pRD043 (11306 pb) (Figure 8) comprenant en plus par rapport au pRD041, le gène LacZ et son promoteur SV40.

Le plasmide pRD053 permet à la fois de remplacer le promoteur naturel de gD par le promoteur HCMV IE et d'introduire, par recombinaison homologue en utilisant le bras 5' correspondant au fragment allant des bases 2152 à 4245 (Zelnik 1993 - supra) (fragment correspondant à la plus grande partie du gène SORF-3, au gène US2 et au début du gène US3) et le bras 3' allant des positions 5747 (A de l'ATG du gène gD) à 6980 (ce qui correspond au gène gD et au polyA).

On comprend que, au lieu d'apporter le gène LacZ, on pourrait tout à fait aussi facilement apporter un gène

codant pour un antigène d'intérêt.

Exemple 3 : Construction du plasmide pRD053 (cassette CMV-gD dans TK)

Le fragment HVT BamHI B (Igarashi T. et al., Virology. 1987, 157, 351-358) contenant le gène TK a été cloné dans le vecteur pBR322 pour donner le plasmide pBamB. Le plasmide pBamB a été digéré par HindIII pour isoler le fragment HindIII-HindIII de 3200 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-SK+ digéré par HindIII pour donner le plasmide pRD046 (Figure 9). Le plasmide pRD046 a été digéré par SalI, réparé avec la polymérase Klenow puis digéré par SacI pour isoler le fragment SalI(K)-SacI de 3200 pb. Ce fragment a ensuite été ligaturé avec le vecteur pUC18 préalablement digéré par HindII et SacI pour donner le plasmide pRD049 (5943 pb). Le plasmide pRD049 a alors été digéré par DraIII (site unique sur pRD049), déphosphorylé par l'action de la phosphatase alcaline, et ligaturé avec un oligonucléotide synthétique double brin obtenu par hybridation des deux oligonucléotides suivants :

RD053 SEQ ID No 5 : 5' GTGGTACCATAGTCGACACCCT 3'
RD054 SEQ ID No 6 : 5' GTGTCGACTATGGTACCACAGG 3'

Le plasmide ainsi obtenu a été appelé pRD051 (Figure 9). Ce plasmide a été digéré par KpnI et SalI pour isoler le fragment KpnI-SalI de 5960 pb (fragment A). Le plasmide pRD040 (voir exemple 1) a été digéré par KpnI et BstBI pour isoler le fragment KpnI-HCMV IE- ATG-BstBI de 800 pb (fragment B). Le plasmide pRD031 a été digéré par BstBI et SalI pour isoler le fragment BstBI-HVT gD-SalI de 1450 pb (fragment C). Les fragments A, B et C ont ensuite été ligaturés ensemble pour donner le plasmide pRD053 (Figure 11) comprenant la cassette de gD insérée dans TK.

Ce plasmide permet l'introduction de cette cassette gD dans le gène TK par recombinaison homologue en utilisant des bras flanquants 5' et 3' respectivement

homologues des régions en amont du site DraIII du gène TK (fragment HindIII-DraIII de 520 pb) et en aval du site DraIII du gène TK (fragment DraIII-HindIII de 2650 pb). Cette insertion conduit à l'inactivation de TK.

5 Ce plasmide est linéarisé par ScaI avant la cotransfection avec l'ADN viral d'HVT.

Exemple 4 : Isolement et purification du virus recombinant vHVT004

10 L'ADN viral utilisé pour les expériences de transfection a été préparé selon la technique décrite par Robin Morgan (Morgan R. W. et al., Avian Diseases, 1990, 34, 345-351 incorporé ici par référence). Le plasmide pRD043 a été digéré par KpnI pour linéarisation, puis
15 extrait avec un mélange phénol/chloroforme (19:1), précipité avec de l'éthanol absolu, et repris dans de l'eau stérile.

Des cellules CEPs primaires de 24 heures ont été transfectées avec le mélange suivant: 5 µg d'ADN viral+ 1µg du plasmide pRD043 linéarisé dans 300 µl de milieu OptiMEM (Gibco) et 100 µg de Lipofectamine (Gibco BRL Ref. 18324-012) dans 300 µl de milieu (volume final du mélange = 600 µl). Ces 600 µl ont été ensuite dilués dans 3 ml (volume final) de milieu et étalés sur $3 \cdot 10^6$ CEPs. Le mélange est
20 laissé 5 heures en contact avec les cellules, puis éliminé et remplacé par 5 ml de milieu de culture. Les cellules sont alors laissées en culture 3 jours à 37° C, puis elles sont pronasées, mélangées à des CEPs secondaires fraîches (mélange 3:1), et réétalées sur boîtes de Petri jusqu'à
25 apparition d'un effet cytopathique (ECP). Le tapis cellulaire est alors pronasé et sert d'inoculum (à raison de 1 plage par boîte) pour des boîtes de 60 mm (contenant $2 \cdot 10^6$ CEPs secondaires). Trois jours après l'inoculation, une couche d'agar est coulée sur le tapis cellulaire. 24
30 heures plus tard, une surcouche d'agar contenant de l'X-Gal

(500 µg par ml final) st coulée. Trois heures après, une coloration bleue intense se développe au niveau des plages contenant les virus recombinants. Chaque plaque bleue est alors repiquée individuellement pour amplification dans une cupule d'une plaque 96 puits. A l'apparition d'un ECP, la cupule est pronasée et sert d'inoculum pour une nouvelle boîte 60 mm. La sélection des plages recombinantes et l'estimation du pourcentage de purification de ces plaques se font comme précédemment par coloration X-Gal des plages sous agar. En général, 4 cycles d'isolements successifs suffisent pour obtenir des virus recombinants dont la totalité de la progénie présente la coloration bleue. Chaque plaque individuelle purifiée à 100 % est alors caractérisée au niveau moléculaire par les techniques PCR et de Southern blot en utilisant les oligonucléotides et les sondes d'ADN appropriés.

Un clone pur à 100% et présentant les caractères du recombinant attendu a été isolé et désigné VHVT004. Ce virus contient une cassette SV40-LacZ insérée entre les gènes US2 et gD ainsi que le promoteur HCMV IE placé directement en amont du gène gD et contrôlant ainsi ce gène dans son site d'origine. Ce virus est donc délété de US3, qui est le site d'insertion.

Exemple 5 : Isolement et purification du virus recombinant VHVT005 (TK-)

L'ADN génomique du virus HVT utilisé pour les expériences de transfection a été préparé comme précédemment (Morgan R. et al., Avian Diseases, 1990, 34, 345-351). Les transfections ont été réalisées avec le plasmide pRDO53 linéarisé par ScaI comme décrit dans l'exemple 3. Après 3 jours de culture, les cellules sont pronasées, mélangées à des CEPs secondaires fraîches et réétalées sur boîtes de Petri. A l'apparition d'un ECP, le tapis cellulaire est pronasé, et sert d'inoculum pour des

boîtes de Petri de 60 mm. La culture est alors effectuée avec un milieu de culture contenant de la 1- β -D-arabinofuranosyl-thymine (ara T) (Sigma) à la concentration finale de 100 μ g/ml de milieu de culture. L'ara T inhibe la
5 réplication des virus HVT TK+ et seuls les mutants naturels TK- ou les recombinants TK- peuvent se répliquer en présence d'ara T. Trois jours après l'infection, une couche d'agar est coulée sur le tapis cellulaire. 24 heures après, les plages virales présentes sur le tapis cellulaire sont
10 repiquées individuellement dans des cupules d'une plaque 96 puits. La culture de ces plages se fait en présence d'araT dans le milieu de culture. A l'apparition d'un ECP, les cupules sont pronasées, des dilutions des cupules infectées sont étalées sur des boîtes de Petri, et un nouveau cycle de culture sous agar est effectué comme précédemment. Après
15 deux cycles de culture en présence d'araT, la culture peut être effectuée en milieu normal. Quatre cycles d'isolement/purification sont suffisants pour obtenir des clones recombinants purs à 100 % pour le caractère TK-. Ces
20 clones sont alors caractérisés au niveau moléculaire avec les techniques habituelles de la biologie moléculaire (PCR, Southern blot, etc...).

Un clone pur à 100% et présentant les caractères du recombinant attendu a été isolé et désigné vHVT005. Ce
25 virus contient le gène gD sous le contrôle du promoteur HCMV IE dans le gène TK, lequel est donc inactivé.

REVENDICATIONS

1- Herpèsvirus naturellement déficient en gD, transformé pour exprimer une glycoprotéine gD au cours de sa répllication in vitro.

5

2- Herpèsvirus selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un herpèsvirus comprenant naturellement un gène gD qui n'est pas exprimé in vitro, tel que le virus MDV, sérotypes 1, 2 et 3.

10

3- Herpèsvirus selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un herpèsvirus ne comportant pas naturellement de gène gD, tel que le virus VZV.

15

4- Herpèsvirus selon la revendication 2, caractérisé en ce que le gène gD du virus est placé sous le contrôle d'un promoteur autre que le promoteur naturel de ce gène et apte à induire l'expression du gène gD in vitro.

20

5- Herpèsvirus selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que le virus comprend une cassette d'expression comportant un gène gD placé sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression lors de la répllication du virus in vitro.

25

6- Herpèsvirus selon la revendication 5, caractérisé en ce que le promoteur inclus dans la cassette est différent du promoteur naturel du gène gD qui est inséré ou est ce promoteur naturel dans la mesure où ce gène gD inséré est issu d'un virus l'exprimant naturellement.

30

7- Herpèsvirus selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que la cassette d'expression est insérée dans un site non essentiel pour la répllication du virus et pour l'efficacité du virus à titre du vaccin.

8- Herpèsvirus selon la revendication 7, caractérisé en ce que, pour MDV sérotypes 1, 2 et 3, le

site d'insertion est choisi parmi le groupe consistant en :
US2, US3, US10, gI, gD, TK, UL13.

5 9- Herpèsvirus selon la revendication 7, caractérisé en ce que, pour VZV, le site d'insertion est choisi parmi le groupe consistant en: TK, US3, gI, gE, gC et région intergénique US3-gI.

10 10- Herpèsvirus selon l'une quelconque des revendications 4 à 9, caractérisé en ce que le promoteur intégré pour assurer l'expression in vitro d'un gène gD est un promoteur fort, tel que le promoteur HCMV IE ou le promoteur SV40.

11- Herpèsvirus choisi parmi le groupe consistant en MDV sérotypes 1, 2 et 3 et VZV, exprimant une glycoprotéine gD au cours de sa répllication in vitro.

15 12- Herpèsvirus selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un gène hétérologue codant pour un antigène d'intérêt, inséré dans son génome de manière que ce gène puisse s'exprimer in vivo.

20 13- Herpèsvirus selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend une cassette d'expression comprenant un gène gD et le gène hétérologue, chacun avec leur promoteur propre, insérée dans un site non essentiel.

25 14- Vaccin comprenant un virus vivant selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

15- Vaccin selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est utilisable par les voies parentérale, orale ou aérienne.

30 16- Vaccin selon la revendication 14 ou 15 caractérisé en ce qu'il est sous forme lyophilisée ou congelée.

17- Procédé de culture d'herpèsvirus naturellement déficient en gD, dans lequel on cultive sur cellules le virus qui a été transformé pour exprimer la

glycoprotéine gD, puis l'on recueille les virions produits dans le surnageant de culture.

18- Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'on cultive un herpèsvirus selon
5 l'une quelconque des revendications 1 à 13.

19- Culture d'herpesvirus, notamment aviaire, tel que MDV sérotypes 1, 2 et 3, susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 17 ou 18.

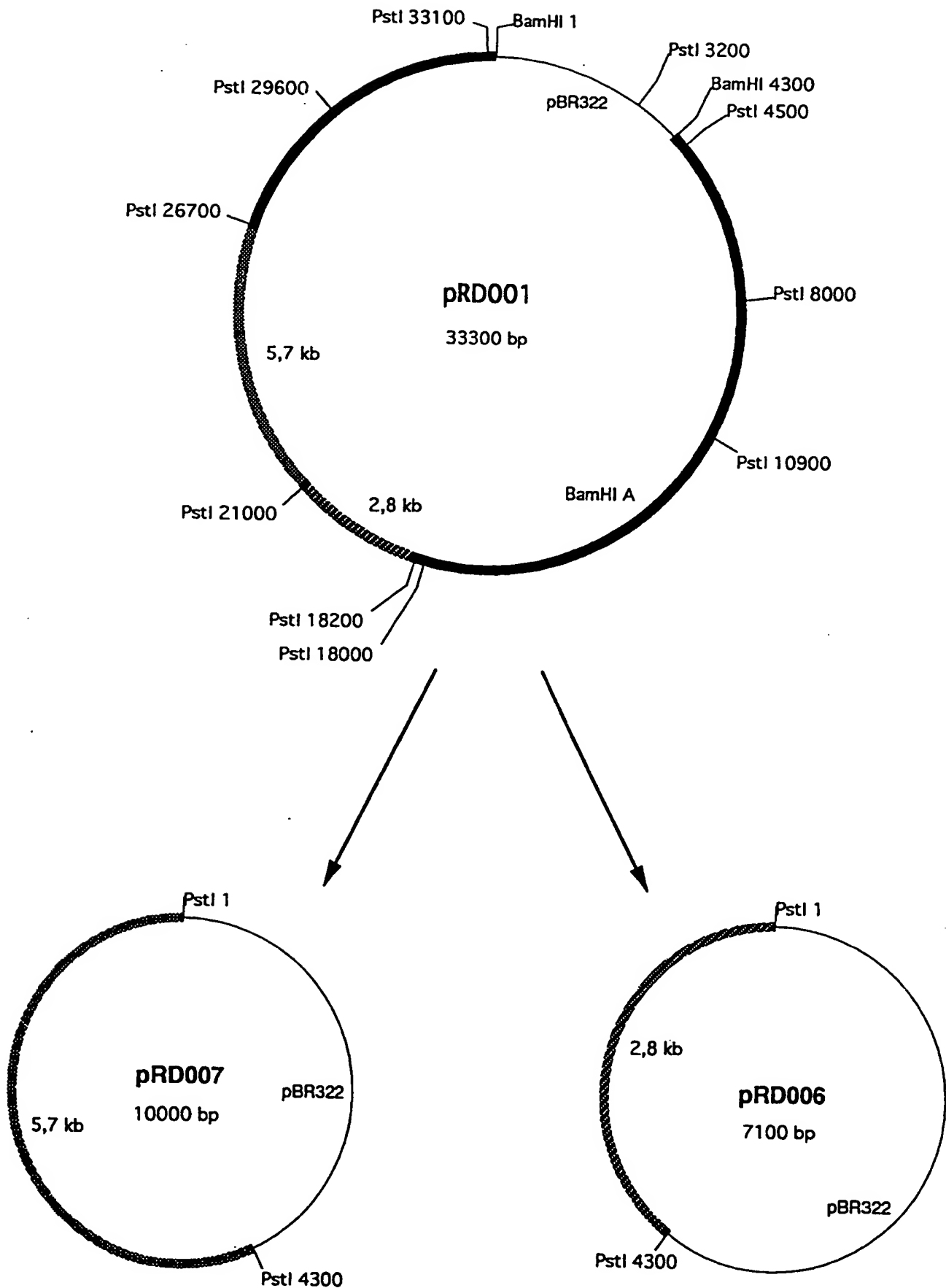
20. Culture d'herpèsvirus MDV sérotype 1, 2, 3 ou
10 VZV, comprenant le virus sous forme de virions libres.

21 - Procédé de production d'un vaccin vivant, caractérisé en ce que l'on cultive sur cellules un herpèsvirus naturellement déficient en gD, qui a été transformé pour exprimer gD lors de sa réplication in vitro
15 et éventuellement transformé pour exprimer in vivo au moins un autre gène hétérologue codant pour un immunogène vaccinal.

22 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 17, 18 et 21, caractérisée en ce que l'on
20 cultive un virus MDV du sérotype 1, 2 ou 3 ou le virus VZV.

23 - Herpèsvirus MDV sérotype 1, 2 ou 3 ou VZV exprimant gD au cours de sa réplication in vivo même en dehors des follicules plumeux.

1/11



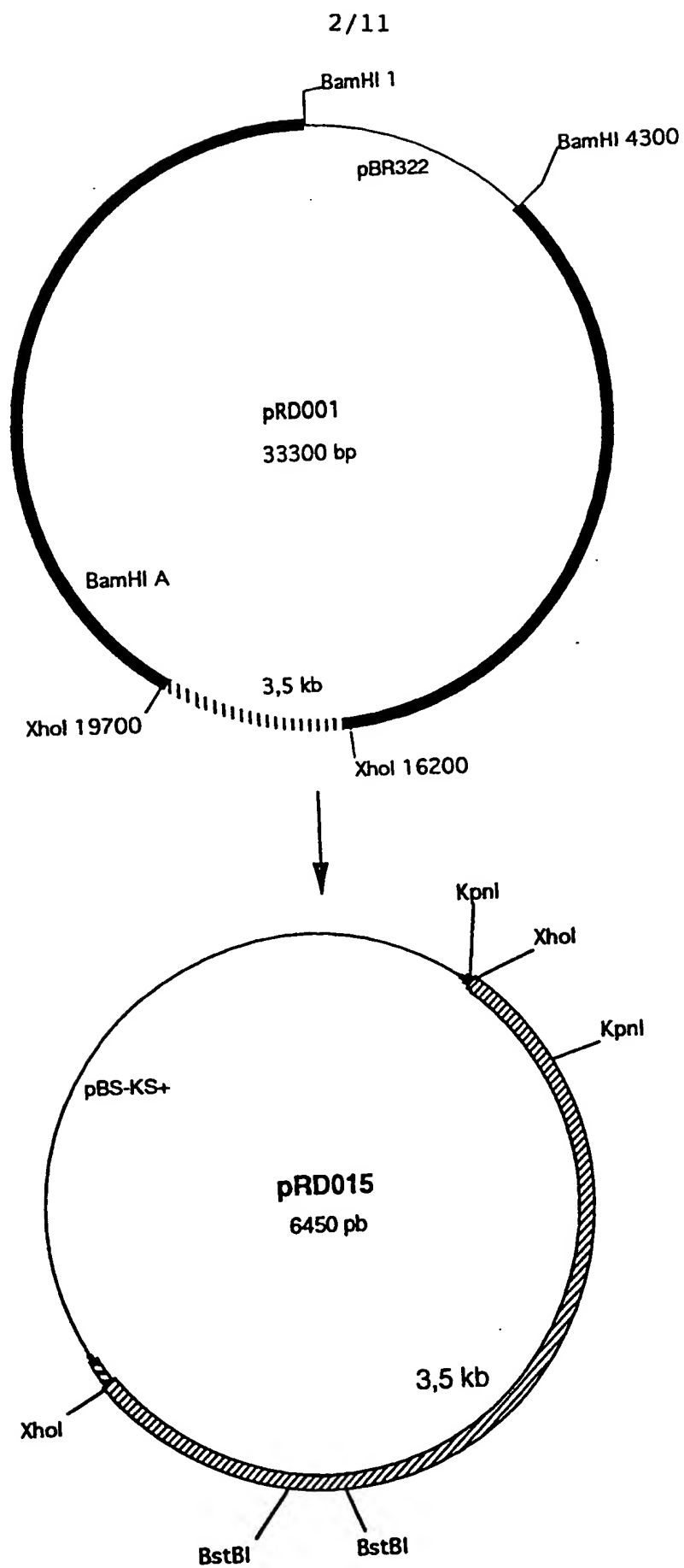
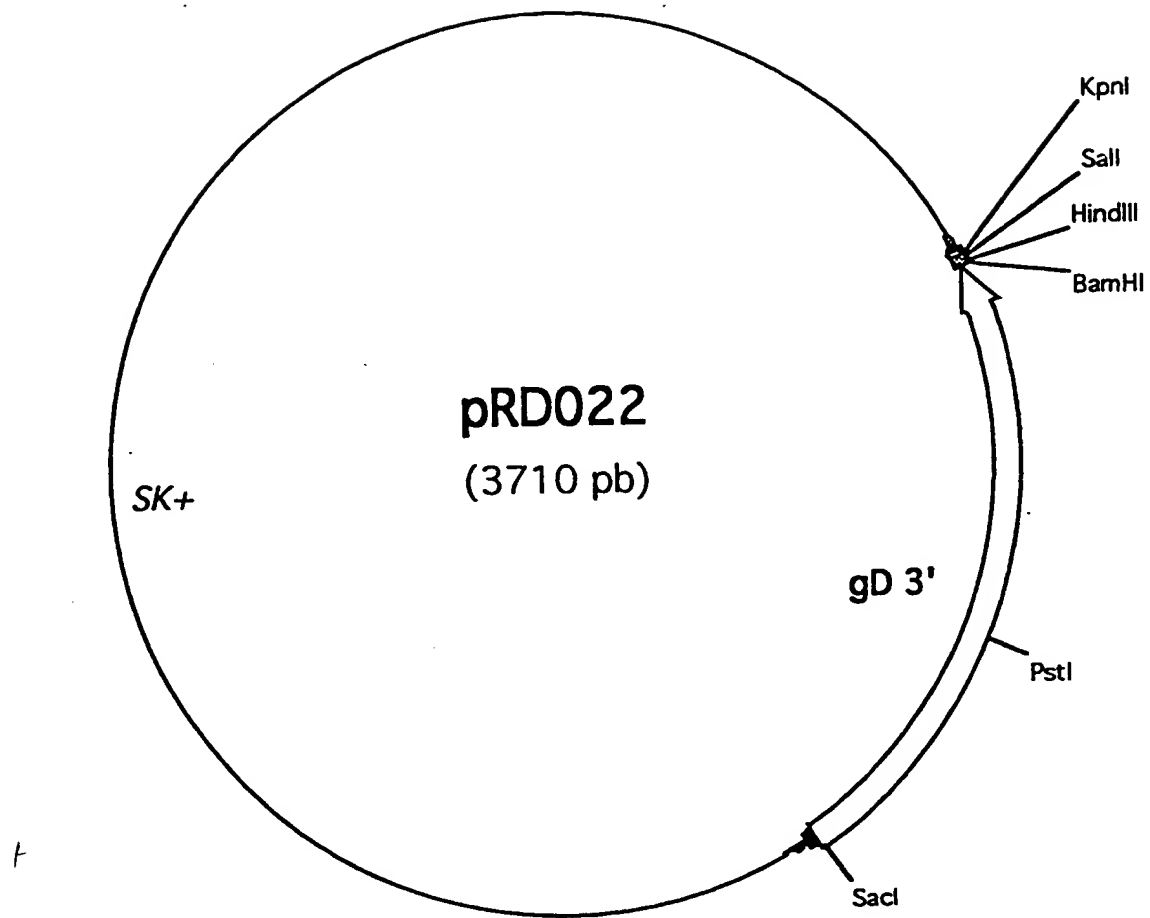
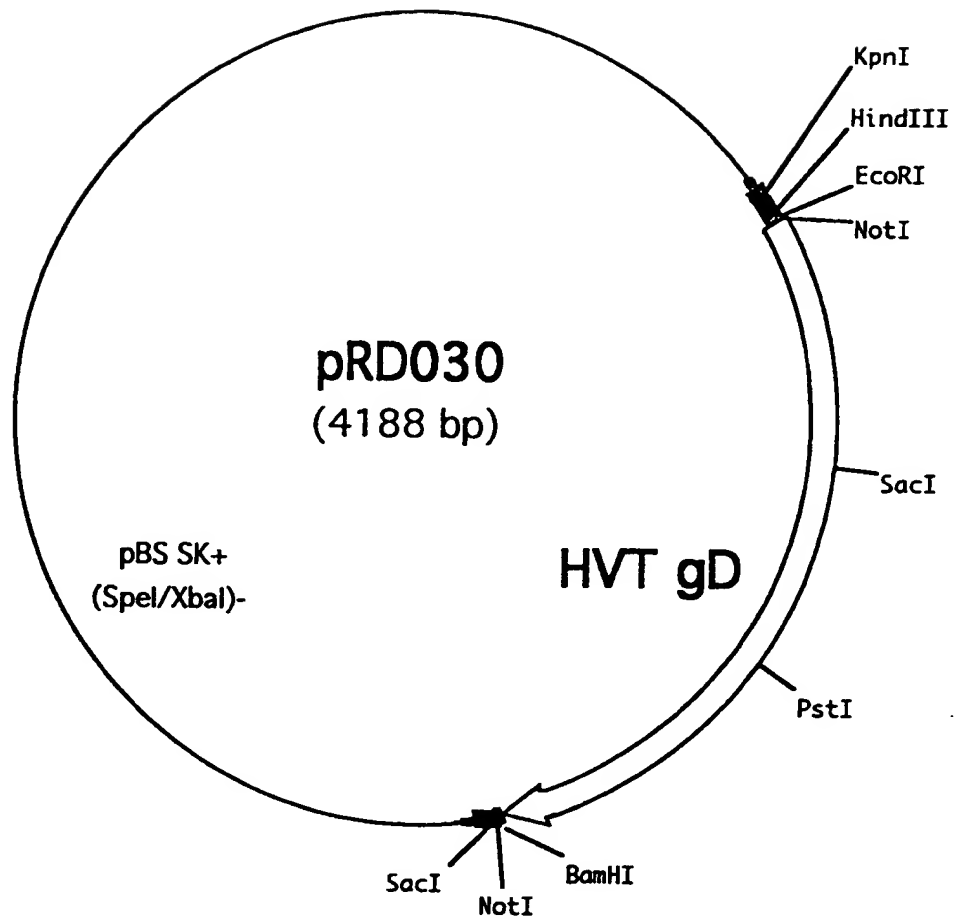


FIGURE 2

**Figure 3**

**Figure 4**

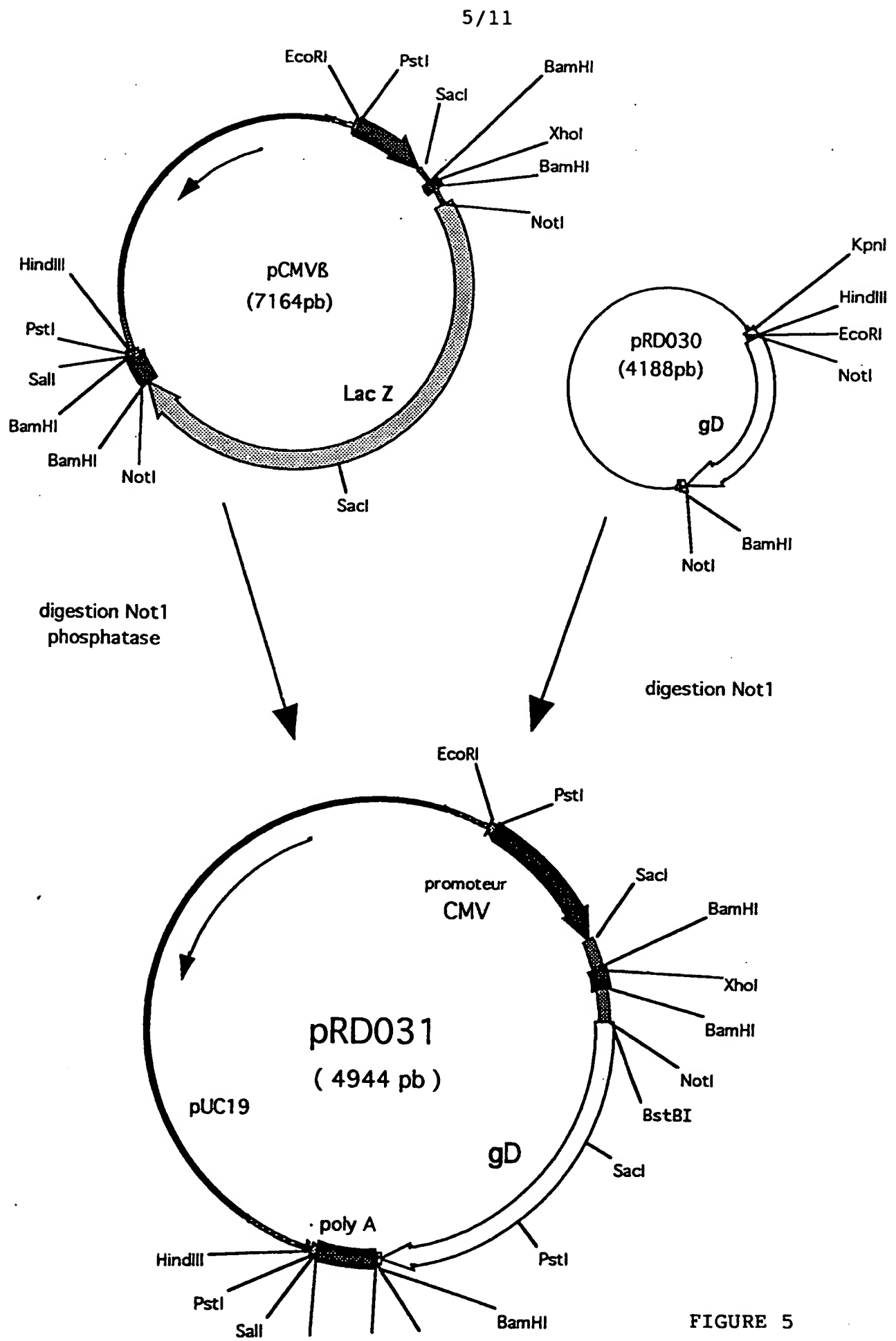
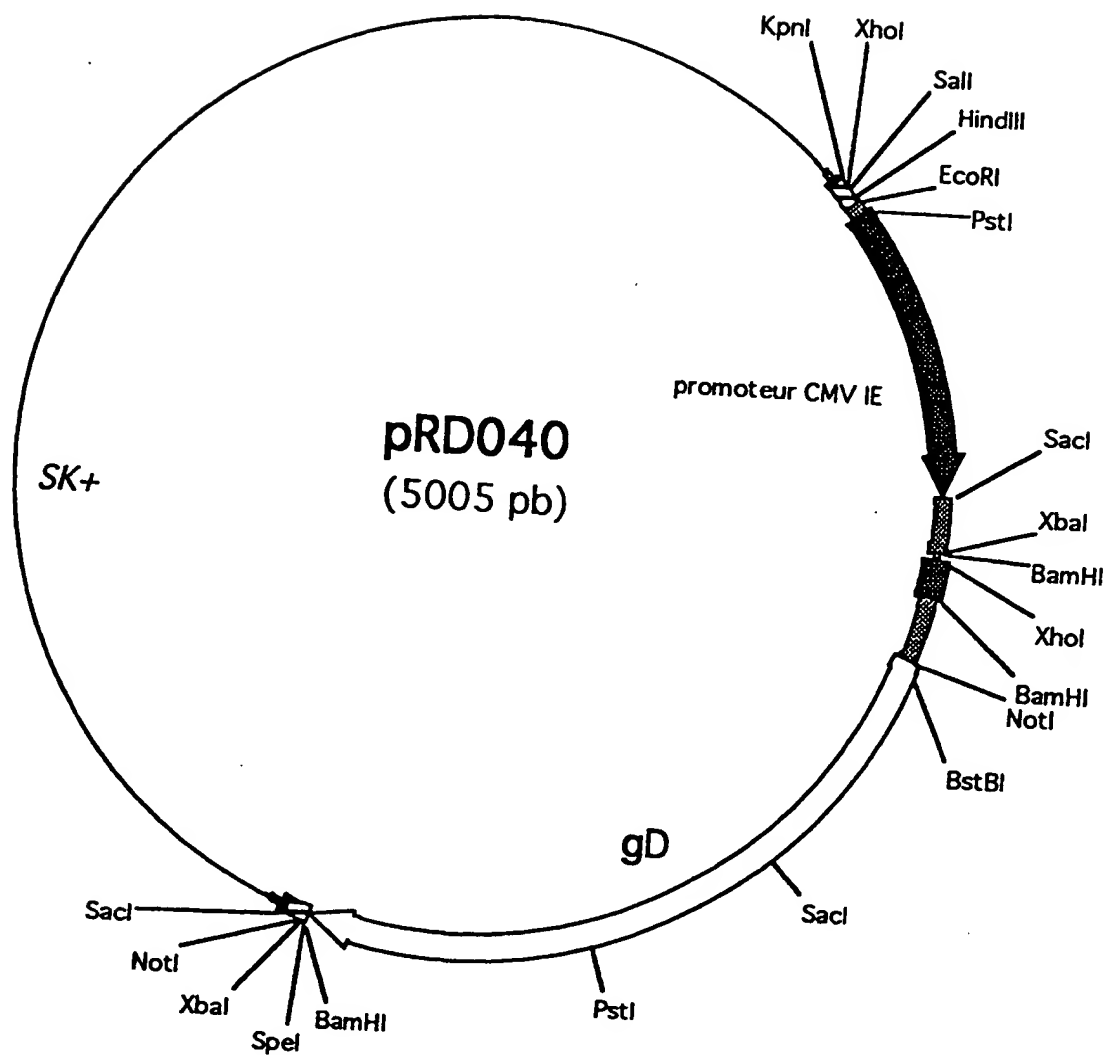


FIGURE 5

6/11

**Figure 6**

7/11

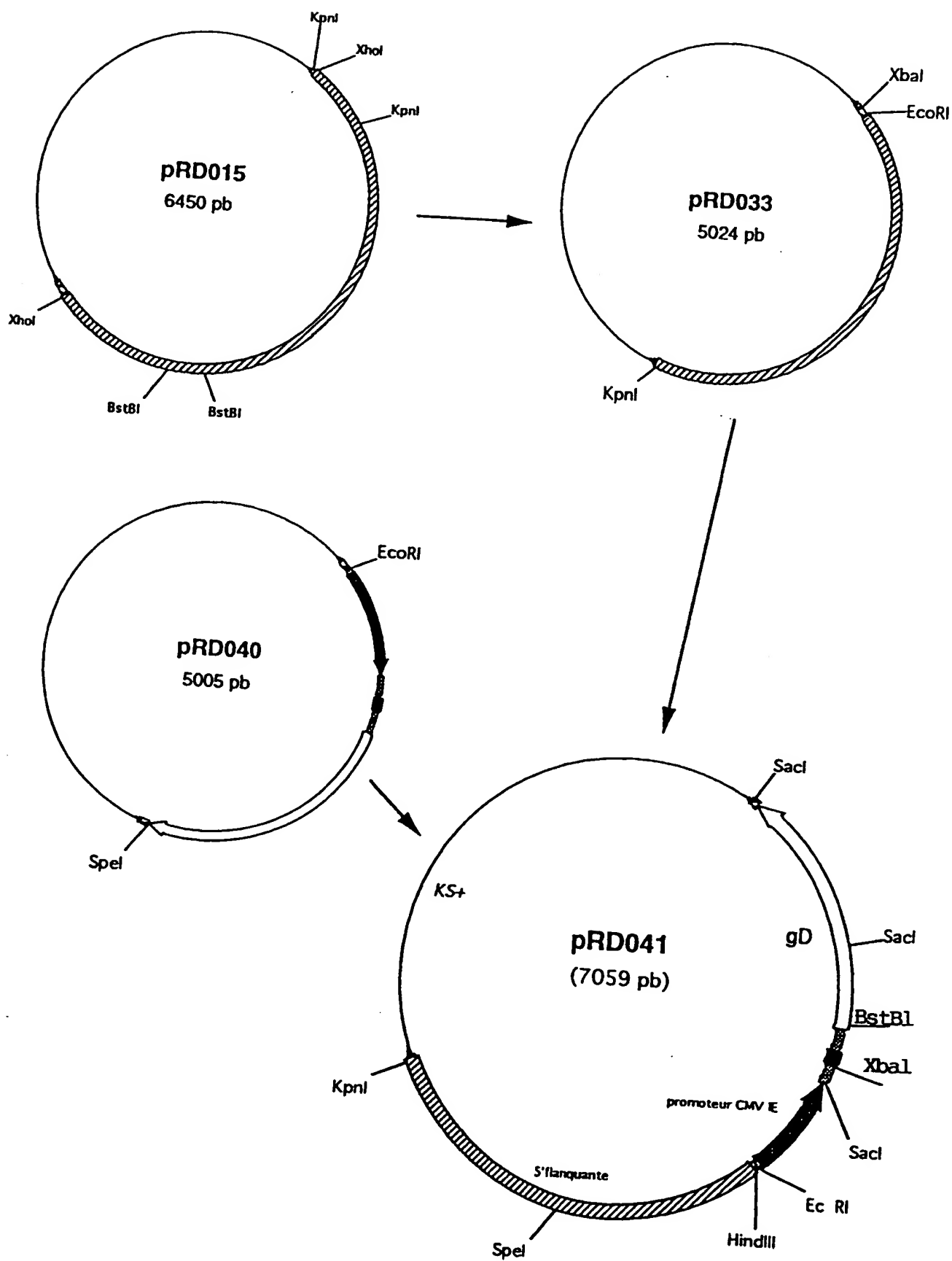


FIGURE 7

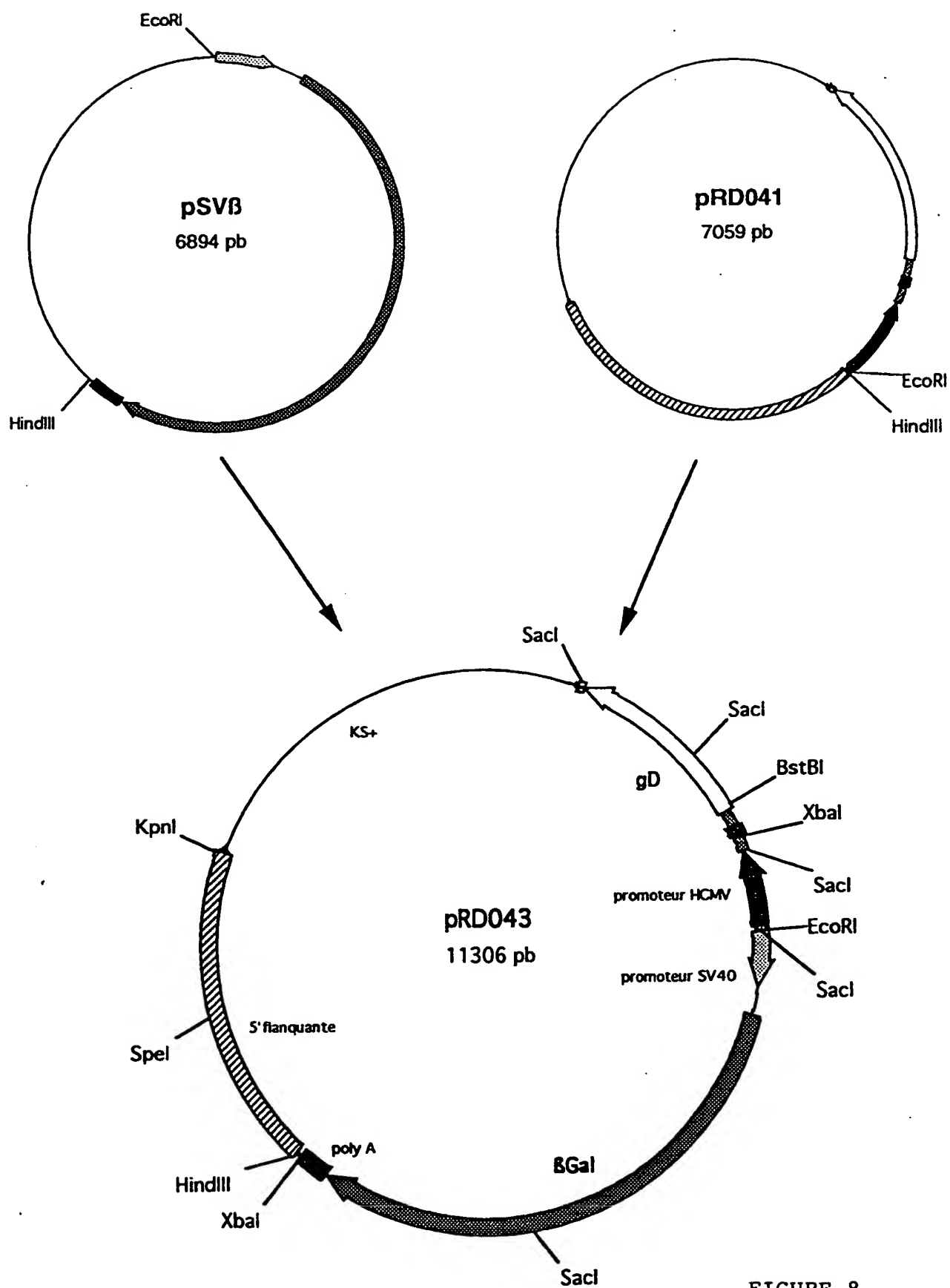


FIGURE 8

9/11

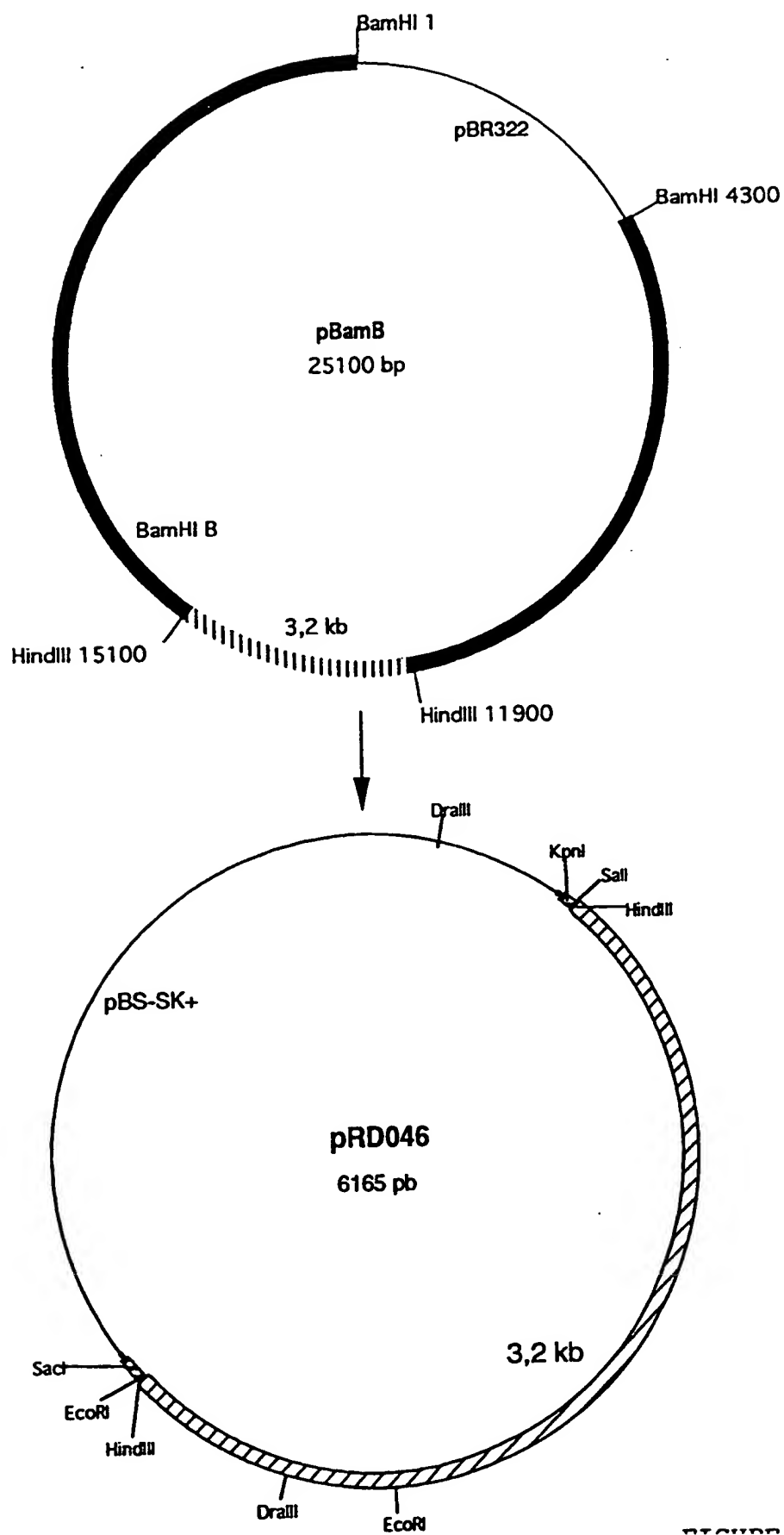


FIGURE 2

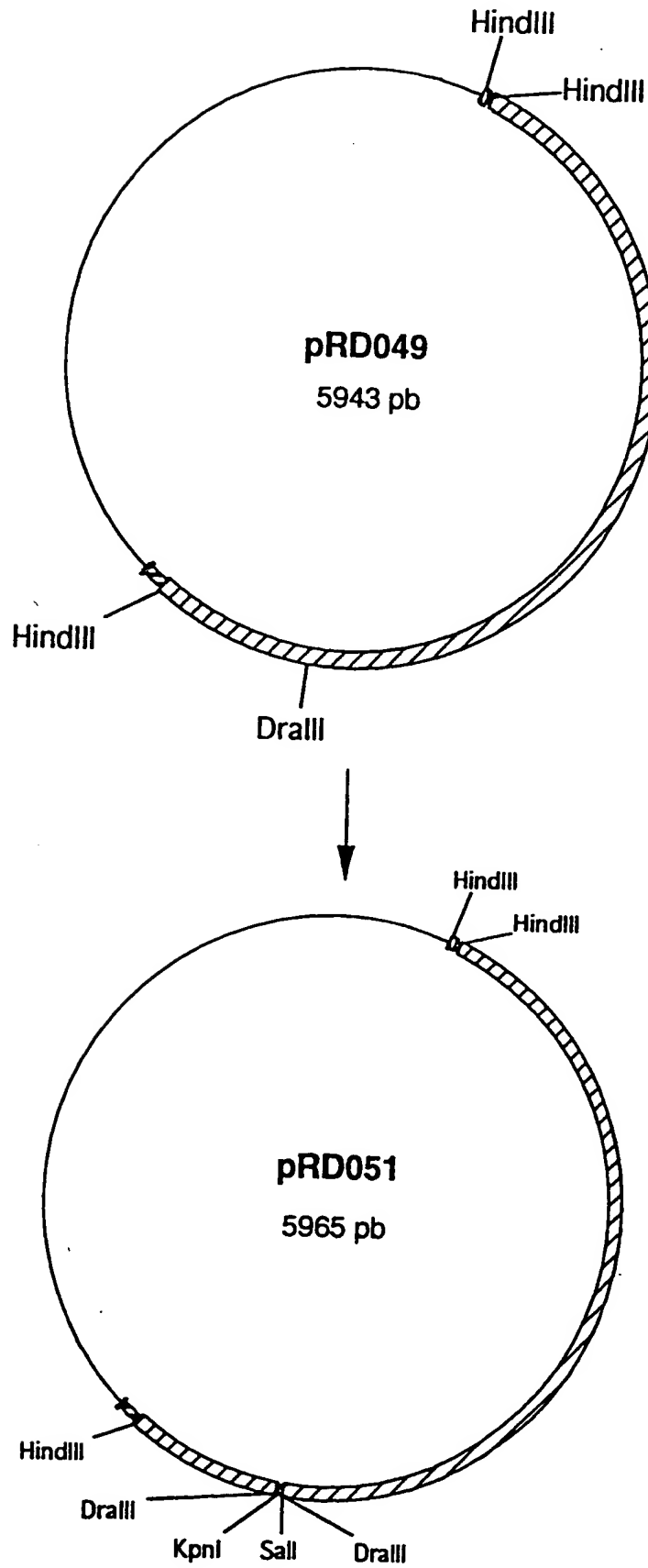


FIGURE 10

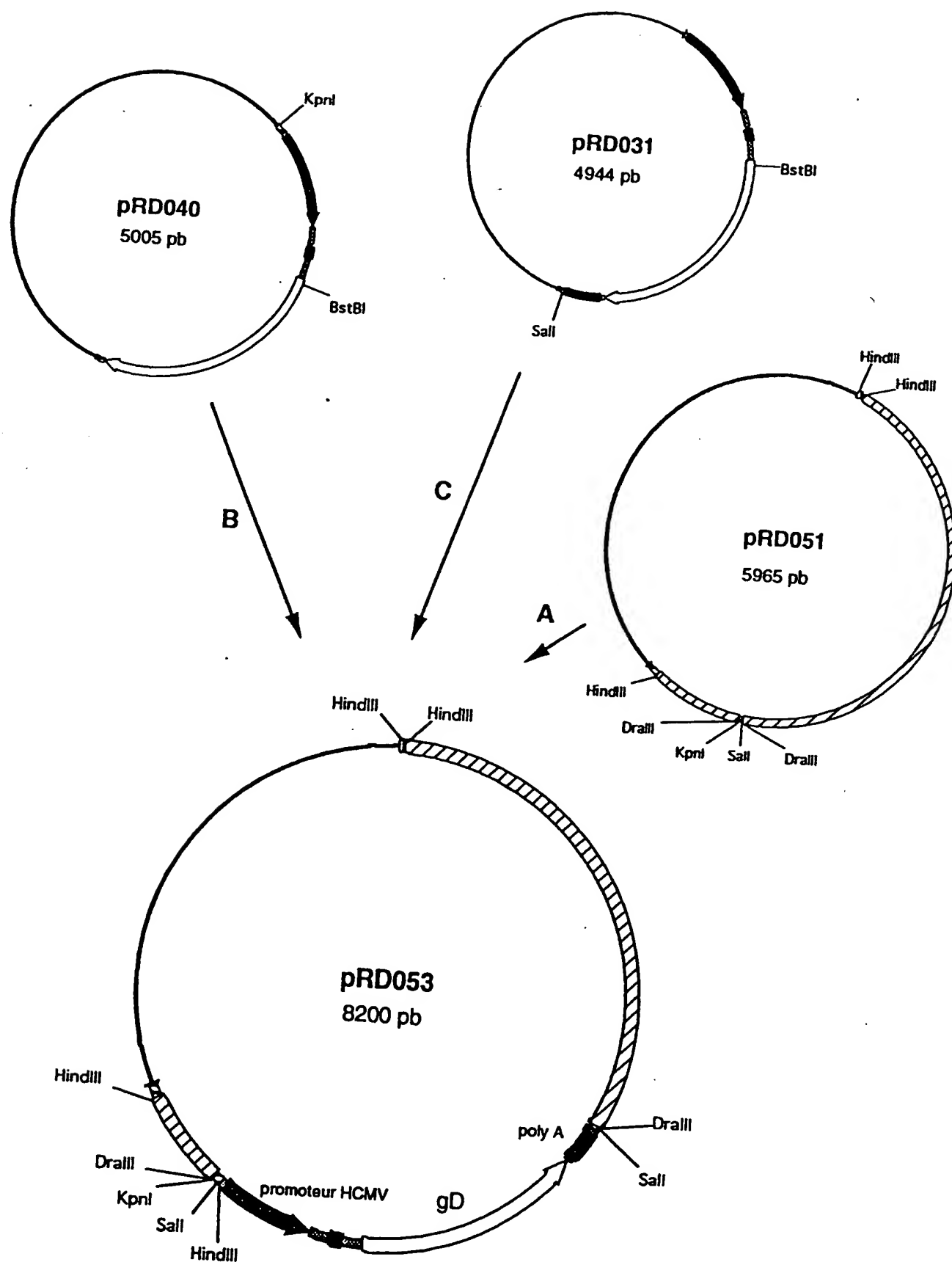


FIGURE 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C12N7/04 C07K14/055 C12N15/38 C12N7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 496 135 (AKZO N.V.) 29 July 1992 see the whole document ---	20
A	WO,A,93 25665 (SYNTRO CORPORATION) 23 December 1993 see page 5, line 28 - page 6, line 30; claims 1,6,7,13,18,26,34,45-64; examples 10,11e,21 ---	1
A	WO,A,90 02803 (RHONE-MERIEUX) 22 March 1990 see claims 1,2,5,6,10,11 ---	1
A	WO,A,92 03547 (MICHIGAN STATE UNIVERSITY) 5 March 1992 see claims 8-11,19 --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 August 1995

Date of mailing of the international search report

15.09.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
FAX (+31-70) 340-2041

Authorized officer

Chambonnet. F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I ational Application No
PCT/FR 95/00502

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,5 231 023 (MORGAN, R.W.) 27 July 1993 see the whole document ---	1
A	EP,A,0 510 996 (THE RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL DISEASES OF OSAKA UNIVERSITY) 28 October 1992 see the whole document ---	1
A	EP,A,0 477 056 (RHÔNE-MERIEUX) 25 March 1992 see the whole document ---	1
A	EP,A,0 447 303 (RHÔNE-MERIEUX) 18 September 1991 see the whole document ---	1
A	EP,A,0 431 668 (AKZO N.V.) 12 June 1991 see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 95/00502

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 23
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Search limited to MDV virus

See annexe
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

MEANINGFUL SEARCH IMPOSSIBLE OR INCOMPLETE SEARCH

Reason: Claim 23 concerns in part a varicella virus (VZV) expressing gD in vivo outside the feather follicles. Since this virus has a tropism to humans, and since at the present time humans with feathers and consequently feather follicles do not appear to exist, this claim seems inconsistent and has not been searched for VZV.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/00502

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0496135	29-07-92	AT-T- 109007	15-08-94
		CA-A- 2058386	25-06-92
		CN-A- 1064409	16-09-92
		DE-D- 69103130	01-09-94
		DE-T- 69103130	01-12-94
		ES-T- 2061165	01-12-94
		JP-A- 4295433	20-10-92
		US-A- 5378467	03-01-95
WO-A-9325665	23-12-93	AU-B- 4536293	04-01-94
		CA-A- 2137930	23-12-93
		EP-A- 0644931	29-03-95
WO-A-9002803	22-03-90	AU-B- 633272	28-01-93
		AU-A- 4214289	02-04-90
		AU-B- 629248	01-10-92
		AU-A- 4325089	02-04-90
		EP-A- 0434721	03-07-91
		EP-A- 0434747	03-07-91
		WO-A- 9002802	22-03-90
		JP-T- 4501658	26-03-92
		JP-T- 4502852	28-05-92
WO-A-9203547	05-03-92	US-A- 5138033	11-08-92
		AU-B- 636247	22-04-93
		AU-A- 8496591	17-03-92
		CA-A- 2066160	25-02-92
		EP-A- 0502146	09-09-92
		JP-T- 4505106	10-09-92
		US-A- 5252716	12-10-93
		US-A- 5252717	12-10-93
US-A-5231023	27-07-93	AU-B- 645333	13-01-94
		AU-A- 8143791	06-02-92
		CN-A- 1060680	29-04-92
		DE-D- 69101683	19-05-94
		DE-T- 69101683	21-07-94
		EP-A- 0473210	04-03-92
		ES-T- 2056565	01-10-94
		JP-A- 6233682	23-08-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/00502

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0510996	28-10-92	JP-A-	6189752	12-07-94
		AU-B-	659449	18-05-95
		AU-A-	1521492	29-10-92
EP-A-0477056	25-03-92	FR-A-	2666589	13-03-92
		AU-B-	657488	16-03-95
		AU-A-	8370891	12-03-92
		CA-A-	2050850	08-03-92
		JP-A-	5168473	02-07-93
EP-A-0447303	18-09-91	FR-A-	2659349	13-09-91
		AU-B-	641493	23-09-93
		AU-A-	7542091	10-10-91
		CA-A-	2055489	13-09-91
		WO-A-	9113995	19-09-91
		JP-T-	5501206	11-03-93
		US-A-	5266489	30-11-93
EP-A-0431668	12-06-91	AU-B-	633663	04-02-93
		AU-A-	6769890	06-06-91
		CN-A-	1052896	10-07-91
		DE-D-	69016956	23-03-95
		DE-T-	69016956	20-07-95
		ES-T-	2070997	16-06-95
		JP-A-	5103667	27-04-93
		US-A-	5187087	16-02-93

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 C de Internationale No
 PCT/FR 95/00502

 A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C12N15/86 C12N7/04

C07K14/055

C12N15/38

C12N7/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 496 135 (AKZO N.V.) 29 Juillet 1992 voir le document en entier	20
A	WO,A,93 25665 (SYNTRO CORPORATION) 23 Décembre 1993 voir page 5, ligne 28 - page 6, ligne 30; revendications 1,6,7,13,18,26,34,45-64; exemples 10,11e,21	1
A	WO,A,90 02803 (RHONE-MERIEUX) 22 Mars 1990 voir revendications 1,2,5,6,10,11	1
A	WO,A,92 03547 (MICHIGAN STATE UNIVERSITY) 5 Mars 1992 voir revendications 8-11,19	1
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 Août 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15.09.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2220 HV Rijswijk
 Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Inde Internationale No

PCT/FR 95/00502

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US,A,5 231 023 (MORGAN, R.W.) 27 Juillet 1993 voir le document en entier ---	1
A	EP,A,0 510 996 (THE RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL DISEASES OF OSAKA UNIVERSITY) 28 Octobre 1992 voir le document en entier ---	1
A	EP,A,0 477 056 (RHÔNE-MERIEUX) 25 Mars 1992 voir le document en entier ---	1
A	EP,A,0 447 303 (RHÔNE-MERIEUX) 18 Septembre 1991 voir le document en entier ---	1
A	EP,A,0 431 668 (AKZO N.V.) 12 Juin 1991 voir le document en entier -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR95/00502

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n° 23
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
Recherche limitée aux virus MDV.

Voir annexe svp.
3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR PCT/ISA/210

RECHERCHE SIGNIFICATIVE IMPOSSIBLE OU INCOMPLETE

Raison: La revendication 23 concerne en partie un virus de la varicelle (VZV) exprimant gD in vivo en dehors des follicules plumeux. Comme ce virus a un tropisme pour l'espèce humaine, qu'en l'état actuel il ne semble pas exister d'humains possédant des plumes et par conséquent des follicules plumeux, cette revendication semble incohérente et n'a pas été cherchée pour VZV.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Internationale No
PCT/FR 95/00502

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0496135	29-07-92	AT-T- 109007	15-08-94
		CA-A- 2058386	25-06-92
		CN-A- 1064409	16-09-92
		DE-D- 69103130	01-09-94
		DE-T- 69103130	01-12-94
		ES-T- 2061165	01-12-94
		JP-A- 4295433	20-10-92
		US-A- 5378467	03-01-95
WO-A-9325665	23-12-93	AU-B- 4536293	04-01-94
		CA-A- 2137930	23-12-93
		EP-A- 0644931	29-03-95
WO-A-9002803	22-03-90	AU-B- 633272	28-01-93
		AU-A- 4214289	02-04-90
		AU-B- 629248	01-10-92
		AU-A- 4325089	02-04-90
		EP-A- 0434721	03-07-91
		EP-A- 0434747	03-07-91
		WO-A- 9002802	22-03-90
		JP-T- 4501658	26-03-92
		JP-T- 4502852	28-05-92
WO-A-9203547	05-03-92	US-A- 5138033	11-08-92
		AU-B- 636247	22-04-93
		AU-A- 8496591	17-03-92
		CA-A- 2066160	25-02-92
		EP-A- 0502146	09-09-92
		JP-T- 4505106	10-09-92
		US-A- 5252716	12-10-93
		US-A- 5252717	12-10-93
US-A-5231023	27-07-93	AU-B- 645333	13-01-94
		AU-A- 8143791	06-02-92
		CN-A- 1060680	29-04-92
		DE-D- 69101683	19-05-94
		DE-T- 69101683	21-07-94
		EP-A- 0473210	04-03-92
		ES-T- 2056565	01-10-94
		JP-A- 6233682	23-08-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

I nde Internationale No
PCT/FR 95/00502

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0510996	28-10-92	JP-A-	6189752	12-07-94
		AU-B-	659449	18-05-95
		AU-A-	1521492	29-10-92
EP-A-0477056	25-03-92	FR-A-	2666589	13-03-92
		AU-B-	657488	16-03-95
		AU-A-	8370891	12-03-92
		CA-A-	2050850	08-03-92
		JP-A-	5168473	02-07-93
EP-A-0447303	18-09-91	FR-A-	2659349	13-09-91
		AU-B-	641493	23-09-93
		AU-A-	7542091	10-10-91
		CA-A-	2055489	13-09-91
		WO-A-	9113995	19-09-91
		JP-T-	5501206	11-03-93
		US-A-	5266489	30-11-93
EP-A-0431668	12-06-91	AU-B-	633663	04-02-93
		AU-A-	6769890	06-06-91
		CN-A-	1052896	10-07-91
		DE-D-	69016956	23-03-95
		DE-T-	69016956	20-07-95
		ES-T-	2070997	16-06-95
		JP-A-	5103667	27-04-93
		US-A-	5187087	16-02-93